(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号 特表2003-532466 (P2003-532466A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int.Cl.7

識別記号

FΙ A61L 27/00 テーマコート*(参考)

4C081

D

A61L 27/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

(21)出顧番号 特願2001-577863(P2001-577863) (86) (22) 出願日

(85)翻訳文提出日

平成13年4月25日(2001.4.25) 平成14年10月24日(2002, 10, 24)

(86)国際出願番号

PCT/US01/13321

(87)国際公開番号

WO01/080760

(87)国際公開日

平成13年11月1日(2001.11.1)

(31)優先権主張番号 60/200,036

(32)優先日

平成12年4月27日(2000, 4, 27)

(33)優先権主張国

米国(US)

(81)指定国

EP(AT, BE, CH, CY,

DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, B R, CA, CN, IL, JP, KP, KR, MX, NO , NZ, SG

(71)出願人 ツァイ,レイ・ジュイーファン

台湾・タイペイ・チェン クン ロード・

セクション 4・2エフ350

(71)出願人 ツェン,シェファー・シイ・ジイ

アメリカ合衆国・333156・フロリダ州・パ インクレスト・サウスウエスト 63アール

ディ プレイス・10000

(72)発明者 ツァイ,レイ・ジュイーファン

台湾・タイペイ・チェン クン ロード・

セクション 4・2エフ350

(74)代理人 弁理士 山川 政樹

Fターム(参考) 4C081 AB11 AB21 BA12 CD34

(54) 【発明の名称】 上皮幹細胞の増殖方法

(57) 【要約】

特別に処理された羊膜上でexvivoで培養された 上皮幹細胞を移植すると、増殖した上皮幹細胞を有する 手術用移植片が羊膜と共に得られる。この移植片を作成 する方法およびその移植片自体は、損傷組織を再建する ための簡便で有効な手段を提供し、好ましい例は角膜組 織である。上皮幹細胞源は、健康な自家および同種組織 生検による極めて小さな外植片でよい。羊膜は、その細 胞外マトリックスが維持されるが、その細胞が死滅する ように処理される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 レシピエント部位に被着される手術用移植片であって、前記移植片が、

羊膜、および

前記羊膜上で増殖した上皮幹細胞を含む手術用移植片。

【請求項2】 前記羊膜が基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が前記基底膜面上で増殖する請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項3】 前記羊膜が、レシピエント部位に被着される前記移植片の面である間質面を有する請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項4】 健康な眼で行われる縁部生検からの縁部組織が前記上皮幹細胞源である請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項5】 前記縁部組織が自己起源である請求項4に記載の手術用移植 片。

【請求項6】 前記縁部組織が異種起源である請求項4に記載の手術用移植 片。

【請求項7】 前記縁部組織が死体に由来する請求項6に記載の手術用移植 片。

【請求項8】 前記縁部組織の表面積がおよそ1~2mm² である請求項4 に記載の手術用移植片。

【請求項9】 前記羊膜が基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が前記羊膜の前記基底膜面上でex vivoに培養される請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項10】 前記上皮幹細胞が培地中で処理された組織に由来し、次いで前記羊膜に移される請求項9に記載の手術用移植片。

【請求項11】 前記羊膜が細胞および完全性を有する細胞外基質を有し、前記 e x v i v o 培養の前に、前記膜の前記細胞は死滅するが、前記細胞外基質の完全性は維持される請求項10に記載の手術用移植片。

【請求項12】 増殖した前記上皮幹細胞が健康な眼からの縁部外植片組織 由来である請求項11に記載の手術用移植片。 【請求項13】 レシピエント部位が眼であり、

前記移植片がレシピエント部位に適用された後には、前記縁部外植片組織が前 記移植片の構成要素として必要のない請求項12に記載の手術用移植片。

【請求項14】 前記移植片が、部分的から完全な縁部角膜損傷があり、正常な中心角膜を有するレシピエント部位にとっての区分状の縁部角膜移植片である請求項12に記載の手術用移植片。

【請求項15】 前記移植片が、完全な縁部および角膜表面損傷を有するレシピエント部位にとっての全層状角膜組織を規定する請求項12に記載の手術用移植片。

【請求項16】 前記上皮幹細胞源が、レシピエント部位に対して生物学的に対応する、組織適合性である健康な部位から採取された生検による組織である請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項17】 損傷したレシピエント部位のための手術用移植片を作製する方法であって、前記方法が、

- a) 健康なドナー部位から生検を入手するステップ(前記生検は上皮幹細胞を含む)、
- b) 羊膜上に前記生検を外植片として配置するステップ、および
- c) 前記上皮幹細胞の前記羊膜上で増殖させるステップとを含む方法。

【請求項18】 前記羊膜が基底膜面を有し、

配置する前記ステップが、前記基底膜面上に前記外植片をマウントすることを含む請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記マウンティングにより、増殖した前記上皮幹細胞が損傷したレシピエント部位に関して表が上になるように配置される請求項18に記載の方法。

【請求項20】 入手する前記ステップに、

健康な眼で縁部生検を実行することが含まれる請求項17に記載の方法。

【請求項21】 実行する前記ステップが同種の眼である請求項20に記載の方法。

【請求項22】 生検を入手する前記ステップが組織適合性のドナー部位か

らである請求項17に記載の方法。

【請求項23】 増殖させる前記ステップに、

配置する前記ステップの前に培地中で前記外植片を培養することが含まれる請求項17に記載の方法。

【請求項24】 培養する前記ステップがex vivoである請求項23 に記載の方法。

【請求項25】 前記羊膜が細胞および細胞外基質を有し、増殖させる前記ステップに、配置する前記ステップの前に、

前記羊膜の前記細胞を死滅させるが、その細胞外基質を維持することが含まれる請求項17に記載の方法。

【請求項26】 増殖させる前記ステップが、

前記羊膜をその外植片と共に、前記上皮幹細胞が直径約2から3cmの面積まで増殖するのに十分な時間培養することを含む請求項17に記載の方法。

【請求項27】 前記培養が、

約2日毎に3週間まで交換する培地を用いることを含む請求項26に記載の方 法。

【請求項28】 前記移植片を外科的にレシピエント部位に固定した後で前 記羊膜からの前記外植片を取り除くことを含む請求項17に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

(発明の分野)

本発明は、上皮幹細胞および縁部(limbal)幹細胞の疲弊症、より具体的には、上皮幹細胞疲弊症の例えば角膜表面再建術におけるこの問題を治療するための方法および移植片に関する。

[0002]

(従来技術)

眼に関しては、正常な眼球表面は角膜、縁部および結膜上皮によって覆われている。それらの明確に区分された細胞表現型は、安定な眼球前方の涙液膜と一緒になって眼表面の完全な状態を維持している。化学火傷または熱傷、スティーヴンスージョンソン症候群、眼の瘢痕性類天疱瘡、縁部領域における度重なる外科手術および凍結療法、コンタクトレンズ装着および重篤な微生物感染に起因する重篤な縁部上皮損傷が、縁部および上皮幹細胞疲弊症の原因となりうる。縁部上皮幹細胞疲弊症は通常、角膜表面上への結膜内生(conjunctivalization)、血管新生、慢性炎症および線維内生ならびに角膜混濁として現れる。

[0003]

縁部疲弊症が片側性または非対称に病変のある両側性である場合には、自家縁部組織移植が推奨されている。自家縁部移植の主要な関心事の一つは、角膜縁の2から3実働時間の領域を測り1または2個の縁部移植片を健康な他眼から摘出しなければならないことである。ドナー眼で可能性のある合併症について記載した一つの報告がある。ウサギによる実験からも、事前に縁部摘出をしてから、続いて中心角膜上皮をドナー眼から摘出する場合には、縁部疲弊症が起きうることが分かった。Pellegrini他(Lancet、349巻、990~993ページ、1997年)は、合計2例の縁部疲弊症患者における角膜表面再建術のために、3T3線維芽細胞支持細胞層上で増殖させた角膜上皮細胞シートの移植について報告した。

[0004]

最近、基質置換として羊膜を移植することが、完全縁部上皮幹細胞疲弊症のウ

サギにおいて角膜表面を再建するのに有効であることがKimおよびTseng (Cornea、15巻、473~84ページ、1995年) によって明らかに された。

[0005]

(発明の要旨)

本発明の一実施態様では、健康な眼から微小な縁部生検により、および培養で得られた縁部幹細胞および上皮細胞を特別に処理した羊膜上で増殖させる。基質としてこのような羊膜を用いることは、炎症を起こしていない縁部間質を修復し、縁部幹細胞および上皮幹細胞集団を増殖させることに役立つ。得られる「製品」を擦過した角膜表面に移植片として移植し、続いて表面角膜切除(heretectom y:ヘレテクトミィ)によって線維血管性内生を除去することができる。眼以外の損傷身体領域の場合には、健康な上皮細胞の生検は、同一または類似した生物学的/組織学的特性を有する、すなわち損傷した領域と組織適合性のある隣接した組織領域から行う。

[0006]

(好ましい実施形態の説明)

縁部生検は健康な眼で行い、その眼は、患者の他眼であっても別の生体からであってもよい。瞼をBetadine(登録商標)(プルビドン(prvidone)-ヨード)で消毒する。無菌条件の下で、上皮細胞および角膜間質組織の一部を含む縁部組織1から2mm を縁部縁から分離し、No.66 Beaver(登録商標)ブレード(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ)による層状角膜切除により表面の角膜間質から切除する。この組織を、1m1当たり0.5%DMSO(ジメチルスルホキシド)、2ugマウスEGF(上皮成長因子)、1ugウシインスリン、0.1ugコレラ毒素および5%ウシ胎仔血清を追加したDMEM(ダルベッコの改良イーグル培地)およびHamのF12(1:1の比)を有する培地1.5m1の入った35mmの皿に入れ、無菌の層流フード中で培養するため、直ちに実験室に送った。

[0007]

羊膜(Bio Tissue、Miami、Fl. から入手)を培養系として

用い、その教示を参照により本明細書に組み込むTseng SCG (Am. J . Opthalmol、124巻、765~774ページ、1997年) および Tseng (米国特許6, 452, 142) によって報告されているように入手 し、処理して保存する。羊膜を、基底膜面を上にして培養プレート上に滑らかに 貼り、使用前に一夜、5%CO2および95%空気の下に37℃で、加湿したイ ンキュベータ中に置いた。縁部外植片の培養は、一部改良を加えて以前に記載さ れたように行う(TsaiおよびTseng、Invest Opthalmo 1 Vis Sci、29巻、97~108ページ、1988年;およびTsa i他、Invest Opthalmol Vis Sci、35巻、3865 ~2875ページ、1994年)。これらの参考文献で教示されているように、 プラスチック製の基質上に移す代わりに、上皮幹細胞を含む縁部外植片を前述の 培地1m1の入った35mmの皿中の羊膜の基底膜面に植える(移す)。培地を 2日毎に交換し、2から3週間培養を維持すると、上皮幹細胞が成長して広がり 、角膜表面再建術用、直径約2から3cmの面積を覆う細胞層が形成される。他 の組織修復については、必要に応じ、上皮幹細胞層をほとんど用いることができ る。

[0008]

角膜修復の例を続けると、角膜縁部におけるペリオトミー(periotomy)後、縁部周辺の(perilimbal)結膜下瘢痕および炎症を起こしている組織を除去して裸の強膜とする。角膜の線維血管性組織は、同種移植縁部移植について記載されている方法(TsaiおよびTseng、Cornea、13巻、389~400ページ、1994年)と同様の方法でNo.57および66Beaverブレードによる層状角膜切除によって除去する。部分から完全縁部角膜損傷はあるが正常な中心角膜を持つこれらの患者の場合には、羊膜と共に培養した縁部上皮幹細胞を区分状の縁部角膜移植片、またはレシピエント眼のサイズに従って作られた縁部等価体として用い、対応するレシピエント縁部領域(90°から360°まで)に移植する。完全縁部および角膜表面損傷のある患者の場合には、全層状角膜組織、または縁部角膜等価体として新規な移植片を用い、層状角膜移植として移植して全領域を覆う。

[0009]

処理した羊膜基剤上で、培養した、適当なサイズの上皮幹細胞シートを貼り、上皮面を上にして全欠損を覆うが、これは蛍光染色またはゆるく付着した元の移植片の存在によって容易に識別することができる。次いで、移植片を障害部位に固定する。障害を受けた角膜の場合には、角膜側の結節10-0ナイロン縫合、および強膜上固定(episcleral anchorage)した周囲結膜縁との結節8-0Vicryl(登録商標)縫合により固定することができる。全手順中、培養上皮幹細胞層は、ヒアルロン酸ナトリウム(hyaluronate)Healon(登録商標)(Pharmacia & Upjohn AB、Uppsala、Sweden)のコーティングにより曝露、乾燥および摩耗から保護する。元の外植片組織は、外科手術の終了時に羊膜から取り除くことができる。この移植片が角膜全体にわたる場合には、眼を一夜圧迫眼帯をあて、翌日から1週間、治療用コンタクトレンズをつける。初めの一週間は1日4回、次の2週間は1日2回、局所用酢酸プレドニゾロン1%溶液を投与し、続いて2から3ヶ月間は1日2回、0.1%フルオロメトロンを手術領域周辺の結膜炎症の重症度に応じて投与する。

[0010]

前述のように、移植片は特別に処理した羊膜の基底膜面上で培養する。 2 から 3 週間後、上皮幹細胞が成長し、羊膜上にサイズが約 2 から 3 c m のシートを 形成する。 フラットマウント (flat-mount) 調製物は、上皮幹細胞層が PAS および Alcianブルー染色に陰性であり、裸の羊膜が紫に染色する ことを示す。組織学的検査は、上皮シートがシートの縁では 4 から 5 層の幹細胞層から構成され、縁と元の外植片組織との間の領域では 1 から 4 層の細胞層から構成されていることを示す。超微細構造検査は、ゆるく幅の広い細胞間隙および 基底膜構造が、基底細胞ー羊膜接合点で高電子密度の細胞間質が巣状に凝集して存在することを示している。

[0011]

眼の治療に特有の本発明の実施形態に関しては、 14.8 ± 1.9 ヶ月という 平均($\pm SD$)追跡期間により、スネレン視力スケールに基づく様々な程度の視力改善が示される。すべての眼が2から4日以内に完全再上皮形成を示し、平均 (\pm SD)期間は2. 7 \pm 0. 8日である。再建された角膜表面では1から2週間以内に炎症が減少し、血管新生が消退する。手術から1ヶ月後には、角膜透明度が改善され、表面は滑らかで濡れやすくなっている。

[0012]

縁部角膜損傷の面積に応じ、特別に調製した羊膜基質上で増殖した培養上皮幹 細胞を縁部等価体または縁部角膜等価体として使用することができる。

[0013]

移植のために比較的大きな角膜縁部片を採取することに起因するドナー眼の縁部疲弊症がウサギで報告されている。したがって、本発明の新たな方法および得られる移植片は、角膜縁部の小片を採取するに過ぎないことから、ドナー眼の可能性のある合併症を実質的に減少させる。さらに、本方法はまた、非対称病変のある両側性縁部疲弊症の眼で行うことができる。特別に前処理した羊膜上での自家上皮幹細胞のex vivo増殖により、2から3週間で移植に十分な上皮幹細胞が得られる。両側性完全縁部疲弊症の患者の場合には、適合性のあるソース、別の関連生体からの角膜縁部を本発明に従って使用することを考慮すべきである。

[0014]

移植のために独自に前処理をした羊膜をベースとする自家上皮幹細胞を使用することにより、上皮化を容易にすること、炎症および瘢痕化を軽減すること、および基底間質性組織が破壊されている場合の基質置換を含む羊膜移植に固有のすべての有益な効果も得られる。最も重要なことには、Tsengに従って前処理された羊膜は、上皮幹細胞を保存し増殖させるための天然基質を提供し、角膜再建術に必要な自家細胞集団を形成する。さらに、自家細胞のみを移植するため、移植後に免疫抑制を必要としない。このように移植された同種幹細胞の場合には、他の細胞タイプのない上皮幹細胞のみを移植することから、拒絶反応発生率を減らすことができる。

[0015]

前述のように、この独自の移植片および特別に処理した羊膜を使用することによる外植片からの上皮幹細胞を増殖させるその形成方法には、眼の外科手術以外

の使用法、例えば火傷した皮膚領域の、特に外植片のドナー部位が小さいことが 必要である場合の修復がある。同様に、小さな外植片を入手する生検は縁部組織 である必要はない。外植片は、健康な組織を有し、上皮幹細胞を含み、移植片に ついてレシピエント部位と組織適合性がなければならない。レシピエント部位と 同一の身体部分から生検ができない場合には、損傷した眼がレシピエント部位で あり他の眼ー健康な眼ーがドナー外植片を提供する好ましい実施形態のとおり、 対応する同様の身体部分を外植片として選択することができる。

[0016]

独自な本発明の手術用移植片およびその作製方法は、当業者が大幅な実験をすることなく実施し、特許請求の範囲に記載される本発明の精神および範囲内にある変更形態を開発するのに十分開示されたと考えられる。

【国際調査報告】

to be of particular relevance "E" earlier document published not on after the international filing date "I" document which may three doubts or priority claim(s) or which is office to establish the publication date of another establish or other epoclar rescon (as spontified) "C" document which published prior to the international filing date but later "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search 27 JULY 2001 Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Faceimite No. (703) 806-8550 Telephone No. (703) 806-8550		INTERNATIONAL SEARCH REPO	ORT	International application No. PCT/US01/13821		
EPIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. 1 26/36, 968/4-3, 1,111 Decementation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields marrebed Electronio data buse consulted during the international search (aume of data buse and, where practicable, search terms used) Electronio data buse consulted during the international search (aume of data buse and, where practicable, search terms used) Electronio data buse consulted during the international search (aume of data buse and, where practicable, search terms used) Electronio data buse consulted during the international search (aume of data buse and, where practicable, search terms used) Electronio data buse consulted during the international search (aumentation of Box C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant co claim No. X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure 1-28 US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure A US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire 1-28 US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire 1-28 Let of the document spithting a care and the data of the set which is not considered to other to calculate the set of search search and the action of the international search (a spithting the argument of prediction spithting the search search and the search of the search and the search searc	IPC(7) :As1B 19/00 US CL :189/898					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification synthele) U.S. 188/808, 682/4-1, 11,11 Decementation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields merched Electronio data base concelled during the interastional search (came of data base and, where practicable, search terms used) Electronio data base concelled during the interastional search (came of data base and, where practicable, search terms used) Electronio data base concelled during the interastional search (came of data base and, where practicable, search terms used) Electronio data base concelled during the interastional search (came of data base and, where practicable, search terms used) Electronio data base and, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure 1-28 US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure Los 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire disclosure Purther documents published and of the act which is not considered to be of predocular shoutants to a cater the international fling take to provide the shoutants of the cater which is not considered to be of predocular shoutants and the cate of the constant and the cate of the shoutants of the cater of the shoutants of the cater of the shoutants are included to a cater the international fling take or provided to account of the cater of the constant and the cater of the account of patterns and the comments of the constant and						
Description rearched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fittle marched Electronic data base consulted during the international rearch (name of data base and, where practicable, seezech terms used) EAST C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANY Category* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure 1-28 A US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire disclosure Destrict adapting the general side of the set which is entire the international filing tale and the consense published are or affect the international filing tale for eachier documents which may three double are of which is engular areas (as specified). A demands which may three double may three double are of which is engular areas (as specified). A demands which may three double may three double area of the strength of the consense published one or affect the international filing tale and the formation of process of the strength of t						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST search terms: anniotic, stem C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure 1-28 A US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure A US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire 1-28 US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire **Comment taffing the general take of the set which is not considerable to be of predicted relevant to be of predicted archives to be of predicted archives to be of predicted archives the set of the particular date of another set of the set of t	l '					
EAST search terms: amnistic, stem C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure A US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire disclosure Further document published affect of the documents A Special adequate of the document of the passage of the set of another of the condition of the policy disclosure Further document published are on the condition of the policy disclosure of the condition of	Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Category* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages X, P US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure 1-28 US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure A US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire 1-28 See patent family annex. See antire 1-28 List document affining his general skis of the art which is not considered to be of potential minutes. See patent family annex. See patent family annex. Interdecember 1978, see entire 1-28 List document with the application with the application with the application with the passage of encourage of the substantial filing date of the art which is related to declarate in the content of particular antivance (the chitacal twention council to passage of causes to content of investion and content of the content of particular antivance (the chitacal twention council to passage of causes to content of content of investion and content of the content of particular antivance (the chitacal twention council to december of causes to content of investion and content of the content of particular antivance (the chitacal twention council to december of causes to content of antivole to favor under sets the investion of the passage of causes to content of investion and caused to content of the content of	EAST					
A US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire Spetial askectes of cited documents document defining the general state of the ard which is not considered to be of predicate relationship to general state of the ard which is not considered to be of predicate relationship to general state of the ard which is not considered to be of predicate relationship to general state of the ard which is not considered to be of predicate relationship to general state of the ard which is not considered to be of predicate relationship to general state of the ard which is not considered to be obsoluble in the relationship to which is to document of predicate relationship to which is to document or equilibries documents or to equilibries documents or the state of t	C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
A US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire US 4,120,649 A (SCHECHTER) 17 October 1978, see entire Spatial calagodas of cited documents documents defining the general tasks of the art which is not considered to be of predicable relationates "A" document defining the general tasks of the art which is not considered to be of predicable relationates "B" excilin footness uphilithat on or after the international filing date "A" does to establish and unable to the order of the state of account of the state of predicable relations to considerate to be of a state of the state of account of the state of state of the state of the state of the state of state of the state of the state of the state of predicable relation to the document is taken along the state of the state of the state of the state of state of the state of the state of the state of the state of state of the state of	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.	
disclosure Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex. Spetial adapties of cited documents: document dafining the general site of the art which is not considered to be of particular schemans are listed in the natural filing data or priority to be of particular schemans (see apolitical) or which is cited to continuate of the patients and results and the principle or theory undolyting the invention cannot be considered to be of particular schemans (see apolitical) or which is cited to continuate relations and another estation to other continuations of the patients and schemans (see apolitical) To document refundable prior to the international filing data by the continuation political prior to the international filing data by the continuation political prior to the international filing data by the continuation political prior to the international scarch political prior to the international political prior to the	X, P	US 6,152,142 A (TSENG) 28 November 2000, see entire disclosure			1-28	
Further doouyments are listed in the continuation of Box C. See patent family annex. Spetal aslagadas of cibel documents: An document lafting he general state of the art which is not considered to be of prefacilar relevance plants for the international filing date or doctors to early classified and the publication of the publication date of another estation or other contents of the publication date of another estation or other agadal resease (as specified) To document referring to an oral isladesame, use, exhibition or other manual published grow to the international filing date but here The document published grow to the international filing date but here The document protecting to an oral isladesame, use, exhibition or other manual to continue to the publication date of another estation or other manual to continue the document protecting to an oral isladesame, use, exhibition or other manual to complete the content of particular relevance; the claimed invention council be contained in the publication of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained in the publication of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of another content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained to the particular advance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of particular relevance; the claimed invention council be contained as a power addition of the content of part	A	US 5,135,915 A (CZARNIECKI et al.) 04 August 1992, see entire disclosure			1-28	
Special astegories of cited documental: "A" document defining its general state of the art which is not considered to be of particular relevance to countries of a countries of or cannot be openitive or cannot be openitive of or cannot be openitive or cannot be openitive or cannot or particular relevance; the claimed invention of the invention of	A					
Special astegories of cited documental: "A" document defining its general state of the art which is not considered to be of particular relevance to countries of a countries of or cannot be openitive or cannot be openitive of or cannot be openitive or cannot be openitive or cannot or particular relevance; the claimed invention of the invention of						
Special astegories of cited documental: "A" document defining its general state of the art which is not considered to be of particular relevance to countries of a countries of or cannot be openitive or cannot be openitive of or cannot be openitive or cannot be openitive or cannot or particular relevance; the claimed invention of the invention of						
document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the set which are after the international filing date of control of particular relevance; the claimed invention assumed be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken shown (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, calibrition or other means "O" document published prior to the international filing date but later that the priority date claimed inventional filing date but later that the priority date claimed. "A" document referring to an oral disclosure, use, calibrition or other means "Date of the actual completion of the international scarch Date of mailing of the international search report 11 October 2001 (11.10.01) Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Faceimile No. (703) 806-8550						
excitor document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another attation or other apoular resource, (as specified, case per control of published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 27 INLY 2001 Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks BOX PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 806-8550 Authorized document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of the decument of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of an invention of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of the decument is taken as invention of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of the constant of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered to involve an invention of the constant of particular relevance; the claimed invention cannot be considered noved or cannot be considered noved or cannot be constant of particular relevance; the claimed invention cannot be constanted to involve an invention of the constanted of invention and invention of the cannot be constanted of invention and invention of the constanted of invention of the constanted of invention and invention of the cannot be constanted of invention and invention of the cannot be constanted of invention and invention of the cannot be constanted of invention and invention of the cannot be constanted of invention of the cannot be constanted of invention and invention of the	"A" document entring the general state of the get which is not considered the manufacture of the property of t					
egodal rescon (as specified) "O" decounsed referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means decounsed profiled prior to the international filing date but here than the priority date claimed The actual completion of the international search Th	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is when the document it taken alone				ed to involve an inventive step	
decomment published prior to the international filling date but later than the priority date claimed. Date of the actual completion of the international search 27 NULY 2001 Date of mailing of the international search 11 October 2001 (11.10.01) Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Faceimite No. (703) 806-8550 Telephone No. (705) 808-0858	decument of particular relevance; "I" decument of particular relevance; considered to investigate of the continuent o		mere alper enop godin nastes en incentico stok :	when the decument is combined		
Date of the actual completion of the international search 97 INLY 9001 Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Faceimile No. (70s) 806-8550 Date of mailing of the international search report 11 October 2001 (11.10.01) Authorized differr INH XUAL MODEEN Telephone No. (70s) 80s-0858	"P" decument published after to the international Ming date but later "ge" decument more of the same related to the					
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks BOX PCT Washington, D.C. 20231 Passimile No. (702) 806-8250 Authorized dilicer TRINH XUAN SECUREN Telephone No. (703) 808-0858	Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report					
Commissioner of Patents and Trademarks BOX PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (702) 806-8250 Telephone No. (703) 808-0868	97 JULY 9	3001	11	October 2001	(11.10.01)	
	Commission Box PCT Washington	er of Patents and Trademarks , D.C. 20231	AINH XUAN			
orm PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1908)*		~~```~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	Telephone No. (7	'0s) 508-08 <i>6</i> 8		

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第2区分

【発行日】 平成17年1月27日(2005.1.27)

【公表番号】特表2003-532466(P2003-532466A)

【公表日】平成15年11月5日(2003.11.5)

【出願番号】特願2001-577863(P2001-577863)

【国際特許分類第7版】

A 6 1 L 27/00

[FI]

A 6 1 L 27/00

V

A 6 1 L 27/00

D

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月1日(2002.11.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

レシピエント部位に被着される手術用移植片であって、前記移植片が、

羊膜、および

前記羊膜上で増殖した上皮幹細胞であることを特徴とする移植片。

【請求項2】

前記羊膜が基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が前記基底膜面上で増殖することを特徴とする請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項3】

健康な眼で行われる縁部生検からの縁部組織が前記上皮幹細胞源であることを特徴とする請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項4】

前記羊膜が基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が培地中で処理された組織に由来し、次いで前記羊膜に移され、

前記上皮幹細胞が前記羊膜の前記基底膜面上でexvivoに培養されることを特徴とする請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項5】

前記羊膜が細胞および完全性を有する細胞外基質を有し、

前記ex vivo培養の前に、前記膜の前記細胞は死滅するが、前記細胞外基質の完全性は維持されることを特徴とする請求項4に記載の手術用移植片。

【請求項6】

前記上皮幹細胞源が、レシピエント部位に対して生物学的および組織適合性である健康な部位から採取された生検による組織であることを特徴とする請求項1に記載の手術用移植片。

【請求項7】

損傷したレシピエント部位のための手術用移植片を作成する方法であって、前記方法が、 a)羊膜上に生検を外植片として配置するステップ(前記生検は上皮幹細胞を含む)、および

b)前記上皮幹細胞の前記羊膜上で増殖させるステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項8】

前記羊膜が基底膜面を有し、

配置する前記ステップが、前記基底膜面上に前記外植片をマウントすることを含むことを 特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記マウンティングにより、増殖した前記上皮幹細胞が損傷したレシピエント部位に関して表が上になるように配置されることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】

増殖させる前記ステップに、

配置する前記ステップの前に培地中で前記外植片を培養することが含まれることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項11】

前記羊膜が細胞および細胞外基質を有し、

増殖させる前記ステップに、配置する前記ステップの前に

前記羊膜の前記細胞は死滅するが、その細胞外基質を維持することが含まれることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項12】

増殖させる前記ステップが、

前記羊膜をその外植片と共に、前記上皮幹細胞が直径約2から3cmの面積まで増殖するのに十分な時間培養することを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項13】

前記移植片を外科的にレシピエント部位に固定した後で前記羊膜からの前記外植片を取り除くことを特徴とする請求項7に記載の方法。